Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät
Charité Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Die Rolle der Quinonoxidoreduktase bei der Progression des neuronalen Zelltodes und Charakterisierung endogener neuroprotektive Systeme

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Charité Universitätsmedizin Berlin

von
Ulrike Susanne Harms
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Hörtnagl

2. Prof. Dr. med. H. Lassmann

3. Priv.-Doz. Dr. med. T. Grune

eingereicht: 16.10.2005
Datum der Promotion: 13.02.2006

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 3
Abstract 4
Einleitung 6
Zielstellungen 7
Methodik 7
Ergebnisse 9
Diskussion 11
Literaturverzeichnis 16
Danksagung 20
Eidestattliche Erklärung 21

Zusammenfassung

In unseren Studien charakterisierten wir neuroprotektive Mechanismen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen für neuronalen Zelltod. Unser Interesse galt Faktoren aus drei Komplexen, die an der Steuerung zellulärer Vitalität teilhaben.

Im Mittelpunkt stand die Untersuchung eines Enzyms des antioxidativen Systems und dessen Einfluss auf den Verlauf neuronaler Schädigung - die kontrovers diskutierte NAD(P)H:Quinonoxidoreduktase (NQO1). Das Aufdecken von Veränderungen der Aktivität, Expression und Lokalisation der NQO1 in Nervenzellen nach unterschiedlichen Modellen der Zellschädigung sollte uns Einblick in dessen Wirkungsweise im Prozess des neuronalen Zelltods geben. Weiterhin beschäftigten wir uns mit hormonellen neuroprotektiven Mechanismen. Das Steroidormon 17 β-Estradiol zeigte in früheren Untersuchungen schützende Eigenschaften nach ischämischem Hirninfarkt. Unterschiedlich wurde dessen Wirkung auf den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen, wie der Alzheimer'schen Erkrankung bewertet. Wir wollten wissen, ob 17 β-Estradiol in apoptotischen Modellen neuroprotektiv wirkt und welche Rezeptoren und Mechanismen involviert sind. Die Rolle des Zytoskelett bildete den dritten Bereich unserer Studien zur Neuroprotektion. Uns interessierte, welchen Einfluss das zytoskelettmodulierende Protein Gelsolin auf neuronale Apoptose nimmt.

Wir arbeiteten mit primären neuronalen Kulturen der Ratte und der Maus sowie mit einem Schlaganfallmodell der Maus *in vivo*. Neuronaler Zelltod wurde *in vitro* mittels Ethyl-Cholin-Aziridinium (AF64A), einem Induktor eines verzögerten apoptotischen Zelltodes, sowie mit Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD) induziert.

Die Ergebnisse zeigen bei beiden *in vitro*-Neurodegenerationsmodellen einen Anstieg der Aktivität der NQO1 mit unterschiedlichen kinetischen Verläufen. Die Hemmung der NQO1 mit den Inhibitoren Dicumarol, Cibacron-Blau oder Chrysin (1-100 nM) schützte die Neuronen gegen die durch AF64A oder OGD ausgelöste Schädigung. In einem fokalen Ischämiemodell der Maus konnte durch intrazerebroventrikuläre Applikation von Dicumarol (30 nM) eine Reduktion des Infarktvolumens um 29% erreicht werden. Hingegen kam es nach chemisch induziertem NQO1-Aktivitätsanstieg durch t-Butylhydroquinon (TBHQ) *in vitro* zur Verstärkung des experimentell gesetzten neuronalen Schadens. Daher stützen unsere Daten die These, dass eine Aktivierung der NQO1 den Prozess des neuronalen Zelltodes potenziert.

Das Hormon 17 β-Estradiol zeigte einen protektiven Einfluß im AF64A-Modell vorallem in neuronalen Kulturen des Septums und Hippokampus', hingegen nicht des Kortex. Diese regional unterschiedliche Wirkung konnte mit einer stärkeren Expression des α-Estrogenrezeptors in Hippokampus und Septum um ca. 50% bzw. 70% im Vergleich zu der im Kortex in Zusammenhang gebracht werden. Die dominierende Rolle des α-Estrogenrezeptors über Aktivierung des Phosphoinositol (PI)-3-Kinasewegs konnte durch Versuche, in denen die PI-3-Kinase gehemmt wurde, bewiesen werden.
Gelsolin (gsn) entfaltet seine antiapoptotische Wirkung über die Depolymerisation des Aktins. $Gsn^{-/-}$-Neuronen zeigten eine verstärkte Vulnerabilität und erhöhte Caspase-3-Aktivität nach apoptotischer Schädigung. Eine vergleichbar protektive Wirkung, wie die des endogenen Gelsolins, konnten wir durch pharmakologische Aktin-Depolymerisation in den Knockout-Kulturen erzielen. Wir vermuten eine Hemmung der Caspase-3-Aktivität durch endogenes Gelsolin als wichtigen neuroprotektiven Mechanismus.
Aus klinischer Sicht könnte vorallem die schützende Wirkung von Dicumarol auf Nervenzellen durch Hemmung der NQO1 besonders im Hinblick auf die breite Anwendung der Cumarine bei der begleitenden Therapie von thrombembolischen Ereignissen, wie dem ischämischen Schlaganfall sowie bestimmter kardiovaskulärer Erkrankungen von großer praktischer Bedeutung sein. Die regionalen Unterschiede des neuroprotektiven Effekts von 17 β-Estradiol lassen erwarten, dass eine mögliche Behandlung bestehender kortikaler Erkrankungen, wie beispielsweise des Morbus Alzheimer, mit Estrogenen aufgrund der geringen kortikalen Expression des Estrogenrezeptors-α nicht zielführend ist.

Abstract

In our studies we characterized different neuroprotective mechanism by in vitro and in vivo models of neuronal cell death. We were interested in factors of three different complexes wich play a role in cellulare vitality. In the centre of our studies there was an antioxidative enzyme and his role in the neuronal cell death-the NAD(P)H:quinone oxidoreductase1. We have investigated in the activity, expression and localisation of this enzyme after neuronal damage. We could show that this enzyme can exacerbate neuronal cell death.
Another point of our work were the steroid hormon 17ß-Estradiol and the neuroprotective character in neurodegeneration. We discovered different expression of the two ß estradiol-receptors alpha and beta in brain caused in different protective potential to cortical, septal and hippocampal structures by the hormon. The cytoskletal protein gelsolin was the third part of

the studies. We could show that the modulation of the cytoskelett were involved in the progression of cell death after cellulare damage.

Schlagwörter:

Apoptose, Gehirn, Dicumarol, NAD(P)H:Quinone-Oxidoreduktase, zerebrale Ischämie, Estradiol, Gelsolin, oxidativer Stress

Keywords:

apoptosis, brain, dicoumarol, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, ischemic stroke, estradiol, gelsolin, oxidative stress

Einleitung

Der neuronale Zelltod wird aufgrund morphologischer Unterschiede, Zeitverlauf und Auftreten in Zusammenhang verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in zwei Typen eingeteilt [1]. Einerseits kann der Zelluntergang in Form einer schrittweisen progressiven Apoptose oder des programmierten Absterbens, als wesentliche Form des physiologischen Zelltodes, ablaufen. Diese Art spielt auch eine entscheidende Rolle bei langsam fortschreitenden neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise bei der Alzheimer'schern Erkrankung, Morbus Parkinson oder Amyotropher Lateralsklerose. Andererseits kann der Zellverlust durch Nekrose erfolgen, als Produkt einer schnellen Schädigung hervorgerufen durch extremen physischen oder toxischen Stress, wie er zum Beispiel beim ischämischen Insult auftritt. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass ein Nebeneinander dieser beiden Formen des Zelluntergangs bei neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen besteht [2-4].

Das antioxidative Enzyms NADPH-Quinonoxidoreduktase (NQO1) ist ein ubiquitär vorkommendes zytosolisches Flavoprotein, das die Zwei-Elektronenreduktion verschiedener Quinone katalysiert. Die Rolle dieses Enzyms wird kontrovers diskutiert und seine Wirkung auf Nervenzellen ist ungeklärt. Zum einen werden ihm protektive Eigenschaften zugesprochen. Es verhindert das Wiedereintreten von Verbindungen in den Redoxzyklus. So wird der Organismus beispielsweise vor der Entstehung von reaktiven Radikalen geschützt. Allerdings kann das Enzym neben seinem chemoprotektiven Potential unschädliche Quinone und Anteile von Aziridiniumverbindungen in reaktivere und somit zytotoxische Produkte überführen [5,6]. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass die NQO1 eine bedeutende Rolle bei der Inhibition der Degradation des proapoptotischen Proteins p53 spielt [7].

Ein weiterer Schwerpunkt unseres Interesses galt dem Steroidhormon 17 β-Estradiol, welches bei Wachstum und Differenzierung eine bedeutende Rolle spielt. Auch im Zentralnervensystem werden Estrogenrezeptoren ubiquitär exprimiert. In epidemiologischen Studien wurde die Substitution von Estrogenen in der Menopause mit einem verminderten Auftreten des Morbus Alzheimer korreliert [8,9]. Protektive Eigenschaften wurden auch in exzitotoxischen Schadensmodellen und beim Schlaganfall nachgewiesen [10].

Elemente des Zytoskeletts, wie Aktinfilamente, bilden ein submembranöses Netzwerk, welches mit Oberflächenrezeptoren und intrazellulären Effektoren interagiert und in den neuronalen Zelltod involviert ist [11,12]. Das zytoskelettmodulierende Protein Gelsolin ist an der Inaktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle beteiligt und kann so Zellen vor

exzitotoxischen Zelltod schützen [12,13]. Die Rolle beim apoptotischen Zelltod ist bisher noch ungeklärt.

Zielstellungen

Ziel der Studien war es, einen besseren Einblick in endogene Mechanismen zu gewinnen, die Neuronen vor schädigenden Einflüssen schützen und daraus mögliche therapeutische Konsequenzen abzuleiten.

1. Es sollte abgeklärt werden, ob es nach verschiedenen Paradigmen der neuronalen Schädigung zu Veränderungen der Aktivität, Expression, Lokalisation des Enzyms NQO1 kommt und inwieweit diese Veränderungen den neuronalen Zelltod beeinflussen.
2. Es interessierte uns die Frage, ob das neuroprotektive Potential von 17 β-Estradiol auch in apoptotischen Modellen nachweisbar ist, welche Rezeptoren und welche Mechanismen in die Protektion involviert sind.
3. Die Untersuchungen zur Rolle des Gelsolins hatten das Ziel nachzuweisen, inwiefern durch Erhöhung der Aktin-Depolymerisierung die neuronale Zelle vor der Auslösung der Apoptose geschützt werden kann.

Methodik

Primäre neuronale Zellkultur: Die Kulturen wurden aus dem zerebralen Kortex, Hippokampus und Septum von Wistarratten-Embryonen und kortikale Kulturen von $gsn^{+/+}$- und $gsn^{-/-}$- Mausembryonen 129/SVxBALB/C [13] (Embryonaltag E17) nach der Methode von Brewer (1995) modifiziert nach Harms *et al.* (2000) präpariert [14,15]. Die Zellen wurden in beschichtete Zellkulturplatten in serumfreies Medium ausgesät.

***in vitro*-Schadensmodelle:** Die Behandlung der primären neuronalen Kulturen erfolgte zwischen dem 10. und 15. Tag *in vitro* (DIV). Das Apoptose-induzierende cholinerge Toxin AF64A (End-konzentration 40 µM) oder die entsprechende Kontrollsubstanz (Vehikel) wurde den Zellkulturen zugegeben. Das Ischämiemodell basiert auf dem Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Die Kulturen wurden in einer deoxygenierten Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) ohne Glukose in der Hypoxiekammer bei 36,5°C für 120 min belassen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde der Zellrasen vom Boden der Vertiefungen gelöst, nach sofortiger Zentrifugation das Sediment in Flüssigstickstoff überführt und bei –80°C aufbewahrt. Die auf Glasplättchen ausgesäten Zellen wurden für immunhistochemische Untersuchungen mit Paraformaldehyd behandelt.

Pharmakologische Substanzen: Zur Inhibition der NQO1-Enzymaktivität wurden die Kulturen mit niedrigen Dosen (1-100 nM) von Dicumarol, Cibacron-Blau oder Chrysin oder dem entsprechenden Vehikel 1h vor AF64A oder der OGD (120 min) vorbehandelt. Die Induktion der NQO1 in kortikalen Kulturen erzeugten wir durch Gabe von TBHQ (5 µM), nach Murphy *et al.*, (1991) [16] für 24 h vor Behandlung der Kulturen mit AF64A bzw. Durchführung einer OGD.

Cycloheximid, welches die Proteinbiosynthese auf Ebene der Ribosomen hemmt, wurde den Zellen 1h vor der AF64A-Gabe verabreicht. Desweiteren erfolgte eine Vorbehandlung der Zellkulturen mit dem Aktin-depolymerisierenden Pilztoxin Cytochalasin D (Cyto D) [17], also in seiner Wirkung dem Gelsolin ähnlich oder dem aktinstabilisierenden Jasplakinolide (Jaspla) [18]. Das 17 β-Estradiol (30 nM-10 µM) wurde den Zellen 20 h vor Schadenssetzung zugegeben.

Quantitative Messung des Zelltodes: Der neuronale Zelltod wurde mittels Lichtabsorbtionsmessung der zytosolischen Laktatdehydrogenase (LDH) aus Mediumproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe von AF64A und OGD quantitativ bestimmt [19]. Morphologisch wurde der Zustand der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt und fotographisch dokumentiert.

Enzymaktivitätsmessung: Die Enzymaktivität der NQO1 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der OGD oder Gabe von AF64A ermittelt. Nach Lysieren des tiefgefrorenen Zellsediments und Proteinmengenbestimmung erfolgte die Enzymaktivitätsbestimmung nach Prochaska und Santamaria (1988) [20].

Enzym- und Immunhistochemie: Die histochemische Darstellung der Enzymaktivität erfolgte nach Murphy *et al.* (1998) [21]. Durch astroglial (GFAP)- bzw. neuronal (MAP-2)-spezifische Marker wurde die Aktivität der NQO1 fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert. Die Estrogenrezeptoren wurden mittels monoklonaler bzw. polyklonalen Antikörper gegen Estrogenrezeptoren und einem Zweit-Antikörper (gekoppelt mit Texas-Rot) mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Bestimmung der Caspase-3-Aktivität: Die Zellen wurden mit einem spezifischen fluoreszierenden Caspase-3-Substrat inkubiert. Die Fluoreszenz repräsentierte die Caspase-3-Aktivität, welche mit einem Fluoreszenz-Multiplatten-Reader gemessen wurde.

In vivo Modell der fokalen cerebralen Ischämie und Verabreichen der Substanz: Unter Narkose wurde den Mäusen intrazerebroventrikulär 2 µl einer Dicumarollösung (30 nM) verabreicht. Nach 10 min wurde mittels eines silikonummantelten Filaments, welches in die Arteria carotis interna vorgeschoben wurde, eine passagere Unterbrechung der Blutzufuhr für

1 h im Bereich der Arteria cerebri media erzeugt. Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte an, mit dem Kryostaten gefertigten, Hirnschnitten. Sie wurden mittels SigmaScan Pro image analysis Software an Hämatoxylin gefärbten 20µm dicken Schnitten quantifiziert. Das indirekte Infarktvolumen wurde nach der Methode von Swanson *et al.* (1990) bestimmt [22].

Statistik: Die statistischen Analysen der erhobenen Daten *in vitro* erfolgten mit one-way ANOVA und Tukey's *post*-hoc Test. Die Daten wurden aus zwei oder drei repräsentativen Experimenten zusammengefasst. Das Infarktvolumen der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde unter Verwendung des unpaired Student's *t*-Test verglichen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit sind den unten aufgeführten Publikationen entnommen und werden wie folgt zitiert:

Referenz # [23]: Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hörtnagl H. (2001) Differential mechanisms of neuroprotection by 17 β-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. J. Neurosci. 21:2600-2609.

Referenz # [24]: Kapinya JK*, Harms U*, Harms C, Blei K, Katchanov J, Dirnagl U, Hörtnagl, H (2003) Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the progression of neuronal cell death *in vitro* and following cerebral ischemia *in vivo*. (* equal contribution). J. Neurochem. 84:1028-1039.

Referenz # [25]: Harms C, Bösel J, Lautenschlager M, Harms U, Braun JS, Hörtnagl H, Dirnagl U, Kwiatkowski DJ, Fink K, Endres M (2004) Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. Mol Cell Neurosci, 25:69-82.

Anstieg der NQO1-Aktivität nach OGD und AF64A: Nach Behandlung der neuronalen kortikalen Kulturen mit OGD stieg die NQO1-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Schwesternkulturen signifikant um mehr als das 1,6- bzw. 2-fache mit biphasischem Verlauf an (Maxima nach 1 h und 24 h). Wurden kortikale neuronale Kulturen dem Toxin AF64A ausgesetzt, zeigte sich 24 h nach Applikation ein Anstieg der Enzymaktivität der NQO1 um das 2,5-fache [Referenz # [24], Abb.1, 2].

Hemmung der Proteinsynthesehemmung verhindert NQO1-Aktivitätsanstieg: Um herauszufinden, ob der Aktivitätsanstieg auf einer *de novo* Synthese des Enzyms basiert, wurden die Kulturen mit Cycloheximid (500 ng/ml) vorbehandelt. Nach Inhibition der

Proteinsynthese war kein Anstieg der Enzymaktivität zu beobachten [Referenz # [24], Tabelle 1].

NQO1-Aktivität vor allem in Astrozyten, aber nach Schädigung auch in Neuronen: Enzym- und immunhistochemisch lokalisierten wir in Kontrollkulturen die NQO1-Aktivität ausschließlich in Astrozyten. 48 Stunden nach AF64A-Gabe konnten wir eine Verstärkung der Aktivität, eine Zunahme der Zahl NQO1-positiver Zellen und darüber hinaus eine Expression der NQO1 in Neuronen nachweisen [Referenz # [24], Abb.3 und Tabelle 2].

Hemmung der NQO1 schützt Neuronen vor AF64A und OGD: Zur Differenzierung, ob der Anstieg der Aktivität der NQO1 einen exazerbierenden oder protektiven Einfluss auf den neuronalen Schaden nimmt, behandelten wir mit den NQO1-Inhibitoren Dicumarol, Cibacron-Blau oder Chrysin. Unter niedrigen Dosen (10-100 nM), die den humanen Plasmakonzentrationen der klinisch eingesetzten Cumarin-Derivate entsprechen, zeigte sich morphologisch und durch den Abfall der LDH ein Schutz gegen die Schädigung durch OGD bzw. AF64A [Referenz # [24], Abb.4,5]. Diese Ergebnisse wurden auch *in vivo* nach fokaler Ischämie bestätigt. Die Analysen der Hirnschnitte 48 h nach der Ischämie ließen signifikant kleinere Infarktvolumina bei Tieren mit Dicumarol-Behandlung erkennen [Referenz # [24], Abb.7].

Die Induktion der NQO1 mittels TBHQ potenziert den Schaden *in vitro*: Nach chemischer Induktion der NQO1 mit TBHQ zeigte sich eine signifikante Potenzierung des Schadens in beiden *in vitro* Modellen der Neurodegeneration. Die verstärkte Schädigung durch TBHQ konnte mit Dicumarol (10-100 nM) aufgehoben werden [Referenz # [24], Abb.6].

17 β-Estradiol schützt hippokampale und septale, aber nicht kortikale Neuronen vor AF64A-induzierter Neurodegeneration: Eine Langzeitvorbehandlung (20 h) mit 17 β-Estradiol (0,1;1,0 μM) vor der AF64A-Behandlung war die niedrigere Dosis (0,1 μM) mit einer signifikanten LDH-Abnahme nach 72 h in hippokampalen und septalen, aber nicht in kortikalen Kulturen verbunden [Referenz # [23], Abb.1].

Niedrigere Expression von Estrogenrezeptor-α in kortikalen Neuronen:

Um herauszufinden, ob die regional unterschiedliche neuroprotektive Wirkung des Hormons von der Existenz spezifischer Estrogenrezeptoren abhängt, untersuchten wir immunzytochemisch deren Expression in den drei untersuchten Hirnstrukturen. In hippokampalen und septalen Kulturen war die Expression des α-Estrogenrezeptors stärker ausgeprägt als die des ß- Estrogenrezeptors. In kortikalen Kulturen überwog jedoch der ß-Estrogenrezeptor wesentlich [Referenz # [23], Abb.6]. Die protektive Wirkung von Estradiol

konnte sowohl nach Blockade der Estrogenrezeptoren (Tamoxifen oder ICI 183,780) und Proteinsynthesehemmung (Cycloheximid) als auch durch Hemmung der PI-3-Kinase (LY 294002) antagonisiert werden [Referenz # [23], Tabelle 2].

Verstärkung der Apoptose bei Fehlen von Gelsolin: Neuronale Kulturen von $gsn^{-/-}$ Mäusen wiesen nach AF64A-Gabe eine stärkere Schädigung als die von $gsn^{-/-}$ Mäusen auf [Referenz # [25], Abb.2D]. Die zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmte Aktivität der Caspase-3 war nach 6 h nachweisbar und stieg im Verlauf nach AF64A-Behandlung an. Sie erschien signifikant höher in $gsn^{-/-}$ Kulturen als in $gsn^{+/+}$ Kulturen [Referenz # [25], Abb.8A].

Das Aktin-depolymerisierende Cyto D bewirkte eine Protektion der $gsn^{+/+}$ und $gsn^{-/-}$ Kulturen gegen AF64A und senkte die Caspase-3-Aktivität auf gleiches Niveau, während die Gabe der Aktin-stabilisierende Substanz Jaspla zu einer Exazerbation des Schadens in $gsn^{+/+}$ und vor allem in $gsn^{-/-}$ Neuronen, verbunden mit einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität, führte [Referenz # [25], Abb.6C-E, 8C].

Diskussion

Bisher war die Rolle der NQO1 im Prozess des neuronalen Zelltodes ungeklärt. Ein Anstieg der glialen Expression des Enzyms wurde in primären embryonalen zerebellären und kortikalen Kulturen als Reaktion auf Alterung und Behandlung mit Glutamat beschrieben. Dies lässt vermuten, dass die NQO1 das Überleben der Zellen in Kultur beeinflusst. Eine Heraufregulation der NQO1 im Hirn zeigte sich in senilen Plaques, neurofibrillären Tangles und in hippokampalen Kulturen bei Patienten mit der Alzheimer´schen Erkrankung [26,27] sowie in der Penumbra nach fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten [28]. Dieser Anstieg der Enzymaktivität der NQO1 wurde als ein Teil des neuroprotektiven Systems nach Auftreten neuronaler Degeneration, wie bei der Alzheimer'schen Erkrankung und als ein limitierender Faktor des ischämischen Schadens angesehen.

Überraschenderweise liefern unsere Daten deutliche Hinweise darauf, dass eine gesteigerte Aktivität der NQO1 eher schädigend als schützend in den verschiedenen Modellen der Neurodegeneration sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wirkt. Bisher wurde die NQO1 als ein antioxidatives Enzym beurteilt, das in Modellen, die oxidativen Stress induzieren, wie die Behandlung mit Glutamat, H_2O_2 oder Dopamin, neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Bei den von uns verwendeten Modellen steht jedoch der oxidative Stress nicht im Vordergrund. Eine signifikante Rolle von freien Radikalen im AF64A-Modell wurde in früheren Arbeiten ausgeschlossen [29]. Auch bei der OGD ist neben dem exzitotoxischen (nekrotischen) Zelltod

ein apoptotischer Typ des Zelltodes, bei dem oxidativer Stress eine untergeordnete Rolle spielt, beteiligt [23,30]. In unseren Untersuchungen kam es sowohl unter der OGD als auch unter AF64A zu einer Heraufregulierung der Enzymaktivität der NQO1. Eine spezifische Hemmung dieser Enzymaktivität durch niedrige Dosen drei verschiedener Hemmstoffen der NQO1 hatte eine Abschwächung des neuronalen Zelltodes *in vitro* und *in vivo* zur Folge, während die chemische Induktion der NQO1 mit TBHQ eine Exazerbation des Schadens *in vitro* verursachte. Daher sprechen unsere Daten für eine Assoziation von neuronalem Schaden mit einem Anstieg der Enzymaktivität.

In Vehikel-behandelten Kulturen war die NQO1-Aktivität vor allem in Astrozyten, jedoch nicht in neuronalen Zellen nachweisbar. Diese Befunde stimmen mit früheren Ergebnissen überein [21,28]. Im Kontrast dazu steht, dass sich die Enzymaktivität nach Exposition mit AF64A nicht nur in Astrozyten sondern auch in Neuronen detektieren ließ. Ähnliches ist im Zusammenhang mit einer krankheitsassoziierten Expression des Proteins und der Enzymaktivität von NQO1 bei hippokampalen pyramidalen Zellen in Hirnen von Alzheimer-Patienten beobachtet worden [27]. Der Anstieg der Enzymaktivität trat 24 h nach Applikation des Toxins auf, zu einem Zeitpunkt, bei dem typische Marker der Apoptose und morphologische Zeichen des Zelltodes noch nicht in Erscheinung treten [23].

Da der Anstieg der Aktivität durch Proteinsynthesehemmung aufgehoben werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich um eine *de novo* Synthese handelt, zumindest im AF64A-Modell. Die Ursache der vermehrten Enzymexpression ist unklar und könnte mit der Genexpression des sogenannten antioxidativen/elektrophilen Elementes (ARE/EpRE) in Zusammenhang stehen. ARE/EpRE ist auch in Astrozyten beschrieben worden [30]. Eine AP-1-artige Struktur enthaltendes ARE/EpRE wurde im NQO1 Gen entdeckt und ist verantwortlich für die basale Aktivität und die Induzierbarkeit [31-33]. Eine große Zahl verschiedener chemischer Verbindungen, von denen mehrere elektrophil sind, können in vielen peripheren Geweben durch die Aktivierung von ARE die Transkription des NQO1-Gens induzieren. ARE wird als elektrophile Gegenwehr zum Schutz vor Neoplasien und Toxizität angesehen [34-36]. Eine Rolle anderer von ARE/EpRE regulierter Gene, wie Glutathion-*S*-Transferase, γ-Glutamylcysteinsynthetase, Thioredoxinreduktase oder Metallothionein-1 und -2 [37-40], kann in unseren Modellen jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Aus der Beobachtung der NQO1-Aktivitätsveränderungen *in vivo* und *in vitro* kann noch nicht abgeleitet werden, ob die Induktion als ein Teil des antioxidativen Abwehrsystems in Antwort auf eine neuronale Schädigung zu sehen ist oder zum neuronalen Schaden führt. Viele Befunde werden dahingehend interpretiert, dass NQO1 durch die Katalysierung der

Zwei-Elektronen-Reduktion verschiedener Quinone zum Hydroquinon Zellen gegen zerstörerisches Redoxrecycling der Quinone schützt und der Erschöpfung von Glutathion und der Entwicklung von Neoplasien entgegenwirkt [33]. Im Gegensatz dazu sprechen unsere Befunde für eine Exazerbation der neuronalen Apoptose durch die Aktivierung der NQO1 in den Modellen der Ischämie und Neurodegeneration *in vitro* und *in vivo*. Erstens wurde durch spezifische Hemmung der NQO1 mittels Dicumarol, Cibacron-Blau oder Chrysin eine Protektion erreicht. Zweitens wurde *in vitro* durch eine chemische Induktion der NQO1 eine durch Dicumarol antagonisierbare Exazerbation des Schadens nach OGD und AF64A hervorgerufen. Ein direkter antioxidativer Prozess von Dicumarol konnte ausgeschlossen werden [41]. Verschiedene Mechanismen, über welche die Aktivierung der NQO1 zur Verstärkung der Apoptose führt, werden diskutiert. Erstens reduziert die NQO1 in Karzinom-Zelllinien nicht-toxische Quinone wie zum Beispiel ε-Lapachone zu zelltoxischen Verbindungen [42]. Zweitens kann die NQO1 auf dem Weg der Apoptose, welcher über den Tumornekrosefaktor vermittelt wird, einwirken. Dies wurde an humanen Brustadenokarzinom-Zelllinien (MCF-7), die NQO1 überexprimieren, demonstriert [43]. Drittens könnte in unserem AF64A-Modell der neuronalen Apoptose die Aktivierung des Aziridiniumrings der Verbindung durch die NQO1 eine Verstärkung der AF64A-Toxizität erklären. Die NQO1 kann die Alkylierungsfähigkeit von Aziridiniumverbindungen durch Öffnung des Aziridiniumrings regenerieren [5]. Viertens, spielt die NQO1 in Kolonkarzinomzellen bei der Regulation des p53 durch dessen Abbauhemmung eine bedeutende Rolle und unterstützt somit die p53-abhängige Apoptose. Im Gegensatz dazu führte der verstärkte Abbau von p53 unter Dicumarol durch Inhibition der NQO1 in γ-bestrahlten Thymozyten zur Suppression der p53-abhängigen Apoptose [7]. Der gleiche Mechanismus könnte bei neuronalen Zellen eine Rolle spielen. Obgleich beim AF64A-induzierten Zelltod eine Abhängigkeit von p53 noch nicht bewiesen ist, so ist die Beteiligung von p53 bei der OGD und zerebralen Ischämie bereits gut belegt [44-46]. Ob die Neuroprotektion, die durch Hemmung der NQO1 erzielt werden kann, mit einem beschleunigtem Abbau von p53, einem Absinken der toxischen Quinonderivate in der Zelle oder einer Herabsetzung der Wirkung des Tumornekrosefaktors in Zusammenhang steht, muss in zukünftigen Studien abgeklärt werden.

Als weitere neuroprotektive Mechanismen, die bereits endogen verfügbar sind, spielen 17 ß-Estradiol und Gelsolin eine wichtige Rolle. Der *in vitro* beobachtete, rezeptorabhängige, neuroprotektive Effekt von 17 β-Estradiol im apoptotischen Schadensmodell differierte in den unterschiedlichen Hirnregionen. Eine Protektion konnte nur in Regionen mit ausgeprägter

Expression des Estrogenrezeptor-α, wie im Septum und Hippokampus jedoch nicht in dem vorwiegend Estrogenrezeptor-β exprimierenden Kortex erzielt werden. Diese Befunde sprechen für eine Involvierung des Estrogenrezeptor-α in die Vermittlung der Neuroprotektion. Auch in anderen Arbeiten finden sich Hinweise auf eine dominante Rolle des Estrogenrezeptors-α. In α-Estrogenrezeptor-Knockout-Mäusen schütze Estradiol nicht gegen ischämischen Schaden. Die neuroprotektive Wirkung blieb hingegen in β-Estrogenrezeptor-Knockout-Mäusen erhalten [47]. Kahlert et al. (2000) konnte zeigen, dass die Aktivierung des IGF-1-Rezeptorwegs, der im Verlauf die Blockade von proapoptotischen Faktoren wie BAD und Caspase 9 bedingt, über den Estrogenrezeptors-α nicht aber über Estrogenrezeptor-β erfolgt [48]. Die Bedeutung der PI-3-Kinase als wichtiger Schritt in der IGF-1-Kaskade und möglicher Mechanismus der schützenden Wirkung von Estradiol konnte auch in unserer Studie bestätigt werden. Die Mechanismen der Neuroprotektion durch Estrogene sind aber nicht nur auf Rezeptorebene zu sehen. Estrogene schützen kortikale Strukturen im exzitotoxischen Schadensmodell (Behandlung mit Glutamat). Diese Wirkung konnte jedoch durch Rezeptorblockade nicht aufgehoben werden [23].

In den Untersuchungen zu Gelsolin demonstrierten wir, dass das Aktinfilament-depolymerisierende Protein Gelsolin Neuronen vor Apoptose schützen kann. Die Befunde der Verstärkung der Caspase-3-Aktivierung in $gsn^{-/-}$ Neuronen bei gleichzeitiger Exazerbation der Schädigung im Vergleich zu $gsn^{+/+}$ legen die Vermutung nahe, dass der protektive Effekt von Gelsolin über eine Hemmung der Caspase-3-Aktivierung erfolgt. Diese Vermutung wird durch Befunde unserer Untersuchung bestätigt, die zeigen, dass die Behandlung der Kulturen mit dem depolymerisierenden Cytochalasin D zur Verminderung der Caspase-3-Aktivierung und gleichzeitig der Schädigung nach AF64A in $gsn^{-/-}$ und $gsn^{+/+}$ führt. Gegenteiliges fand sich bei Gabe des zytoskelettstabilisierenden Jasplakinolide in $gsn^{-/-}$ Neuronen. Obgleich gsn ein Substrat von Caspase-3 ist und so ein Glied in der apoptotischen Kaskade darstellen könnte [49], ist in anderen Gruppen gezeigt worden, dass gsn Apoptosewege blockieren kann, in die Caspase-3 und Mitochondrien involviert sind [50,51]. Der im AF64A-Modell auftretende Verlust des mitochondriellen Membranpotential war in $gsn^{-/-}$ Neuronen stärker ausgeprägt. Die pharmakologische Stabilisierung des Membranpotential der Mitochondrien durch Permeabilitätsminderung der Membranporen führte zu einer geringeren Caspase-3-Aktivierung und Verminderung der Schädigung nach AF64A in $gsn^{-/-}$ und $gsn^{+/+}$. Daraus kann geschlossen werden, dass gsn seinen neuroprotektiven Effekt in der Apoptose-Kaskade durch die Reduzierung der Permeabilität von Membranporen der Mitochondrien vor dem

Schritt der Caspase-3-Aktivierung entfaltet. Mit diesen Daten konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass endogenes Gelsolin antiapoptotische Effekte in kortikalen Neuronen zeigt [Referenz # [25]].

In den vorliegenden Studien haben wir die Bedeutung von drei sehr unterschiedlichen Schutzmechanismen für neuronale Zellen oder für neuronales Gewebe in verschiedenen Schadensmodellen *in vitro* und *in vivo* detaillierter definiert. Die Ergebnisse dienen möglicherweise als Basis für das bessere Verständnis bei der Entwicklung therapeutischer Ansatzpunkte zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Die Behandlung der Alzheimer'schen Erkrankung mit Estrogenen erscheint nach unserer Datenlage nicht sinnvoll, da ein protektiver Effekt auf kortikale Strukturen wegen der geringen Expression des α-Estrogenrezeptors nicht zu erwarten ist.

Die Neuroprotektion durch Hemmstoffe der NQO1 sowohl *in vitro* als auch in einem ischämischen Schlaganfallmodell *in vivo* ist von klinischer Relevanz. Ungefähr 80% der klinisch diagnostizierten Schlaganfälle sind ischämischer Art. Die Prävention von Patienten mit prädisponierenden Faktoren schließt normalerweise die pharmakologische Beeinflussung von Gerinnungsparametern ein. Cumarin-Derivate, welche die Viatmin-K abhängige γ-Carboxylierung verschiedener Gerinnungsfaktoren hemmen, finden weitverbreitete Anwendung bezüglich dieser Indikation. Auf der Basis unserer Ergebnisse könnte die Applikation von Cumarin-Derivaten durch die neuroprotektive Wirkung der Enzymhemmung der NQO1 einen zusätzlichen Nutzen sowohl bei der Prävention als auch bei der akuten Therapie des ischämischen Schlaganfalls bringen.

Literaturverzeichnis

1. Kerr,J.F. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**, 13-20 (1971).

2. Linnik,M.D., Zobrist,R.H. & Hatfield,M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24**, 2002-2008 (1993).

3. Fink,K. *et al.* Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 1071-1076 (1998).

4. Endres,M. *et al.* Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 238-247 (1998).

5. Ngo,E.O., Nutter,L.M., Sura,T. & Gutierrez,P.L. Induction of p53 by the concerted actions of aziridine and quinone moieties of diaziquone. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 360-368 (1998).

6. Pink,J.J. *et al.* NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **275**, 5416-5424 (2000).

7. Asher,G., Lotem,J., Cohen,B., Sachs,L. & Shaul,Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1188-1193 (2001).

8. Paganini-Hill,A. & Henderson,V.W. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am. J. Epidemiol.* **140**, 256-261 (1994).

9. Robinson,D., Friedman,L., Marcus,R., Tinklenberg,J. & Yesavage,J. Estrogen replacement therapy and memory in older women. *J. Am. Geriatr. Soc.* **42**, 919-922 (1994).

10. Hurn,P.D. & Macrae,I.M. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 631-652 (2000).

11. Allison,D.W., Gelfand,V.I., Spector,I. & Craig,A.M. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J. Neurosci.* **18**, 2423-2436 (1998).

12. Furukawa,K. *et al.* The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **17**, 8178-8186 (1997).

13. Endres,M. *et al.* Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *J. Clin. Invest* **103**, 347-354 (1999).

14. Brewer,G.J. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* **42**, 674-683 (1995).

15. Harms,C. *et al.* Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. *FASEB J.* **14**, 1814-1824 (2000).

16. Murphy,T.H., De,L.M. & Coyle,J.T. Enhanced NAD(P)H:quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress. *J. Neurochem.* **56**, 990-995 (1991).

17. Kwiatkowski,D.J. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 103-108 (1999).

18. Bubb,M.R., Senderowicz,A.M., Sausville,E.A., Duncan,K.L. & Korn,E.D. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14869-14871 (1994).

19. Koh,J.Y. & Choi,D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods* **20**, 83-90 (1987).

20. Prochaska,H.J. & Santamaria,A.B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **169**, 328-336 (1988).

21. Murphy,T.H., So,A.P. & Vincent,S.R. Histochemical detection of quinone reductase activity in situ using LY 83583 reduction and oxidation. *J. Neurochem.* **70**, 2156-2164 (1998).

22. Swanson,R.A. *et al.* A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 290-293 (1990).

23. Harms,C. *et al.* Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J. Neurosci.* **21**, 2600-2609 (2001).

24. Kapinya,K.J. *et al.* Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the progression of neuronal cell death in vitro and following cerebral ischaemia in vivo. *J. Neurochem.* **84**, 1028-1039 (2003).

25. Harms,C. *et al.* Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol. Cell Neurosci.* **25**, 69-82 (2004).

26. Raina,A.K., Templeton,D.J., Deak,J.C., Perry,G. & Smith,M.A. Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease. *Redox. Rep.* **4**, 23-27 (1999).

27. Wang,Y., Santa-Cruz,K., DeCarli,C. & Johnson,J.A. NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Aalzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 525-531 (2000).

28. Laxton,A.W., Sun,M.C., Shen,H., Murphy,T.H. & Honey,C.R. The antioxidant enzyme quinone reductase is up-regulated in vivo following cerebral ischemia. *Neuroreport.* **12**, 1045-1048 (2001).

29. Gottron,F.J., Ying,H.S. & Choi,D.W. Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol. Cell Neurosci.* **9**, 159-169 (1997).

30. Murphy,T.H. *et al.* Preferential expression of antioxidant response element mediated gene expression in astrocytes. *J. Neurochem.* **76**, 1670-1678 (2001).

31. Duffy,S., So,A. & Murphy,T.H. Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. *J. Neurochem.* **71**, 69-77 (1998).

32. Moehlenkamp,J.D. & Johnson,J.A. Activation of antioxidant/electrophile-responsive elements in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**, 98-106 (1999).

33. Dinkova-Kostova,A.T. & Talalay,P. Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 231-240 (2000).

34. Li,Y. & Jaiswal,A.K. Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* **268**, 21454 (1993).

35. Prestera,T., Zhang,Y., Spencer,S.R., Wilczak,C.A. & Talalay,P. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity. *Adv. Enzyme Regul.* **33,** 281-296 (1993).

36. Valerio,L.G.J., Kepa,J.K., Pickwell,G.V. & Quattrochi,L.C. Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol. Lett.* **119**, 49-57 (2001).

37. Ahlgren-Beckendorf,J.A., Reising,A.M., Schander,M.A., Herdler,J.W. & Johnson,J.A. Coordinate regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferases in primary cultures of rat neurons and glia: role of the antioxidant/electrophile responsive element. *Glia* **25**, 131-142 (1999).

38. Iwata-Ichikawa,E., Kondo,Y., Miyazaki,I., Asanuma,M. & Ogawa,N. Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione synthesis. *J. Neurochem.* **72**, 2334-2344 (1999).

39. Campagne,M.V., Thibodeaux,H., van,B.N., Cairns,B. & Lowe,D.G. Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.* **20**, 5200-5207 (2000).

40. Eftekharpour,E., Holmgren,A. & Juurlink,B.H. Thioredoxin reductase and glutathione synthesis is upregulated by t-butylhydroquinone in cortical astrocytes but not in cortical neurons. *Glia* **31**, 241-248 (2000).

41. Hoult,J.R. & Paya,M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* **27**, 713-722 (1996).

42. Planchon,S.M. *et al.* beta-Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. *Exp. Cell Res.* **267**, 95-106 (2001).

43. Siemankowski,L.M., Morreale,J., Butts,B.D. & Briehl,M.M. Increased tumor necrosis factor-alpha sensitivity of MCF-7 cells transfected with NAD(P)H:quinone reductase. *Cancer Res.* **60**, 3638-3644 (2000).

44. Crumrine,R.C., Thomas,A.L. & Morgan,P.F. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 887-891 (1994).

45. Banasiak,K.J. & Haddad,G.G. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* **797**, 295-304 (1998).

46. Culmsee,C. *et al.* A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* **77**, 220-228 (2001).

47. Dubal,D.B. *et al.* Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1952-1957 (2001).

48. Kahlert,S. *et al.* Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 18447-18453 (2000).

49. Kothakota,S. *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-298 (1997).

50. Azuma,T., Koths,K., Flanagan,L. & Kwiatkowski,D. Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. *J. Biol. Chem.* **275**, 3761-3766 (2000).

51. Koya,R.C. *et al.* Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **275**, 15343-15349 (2000).

Danksagung

Mein tiefer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heide Hörtnagl für die Überlassung des Promotionsthemas und für die exzellente Betreuung und Förderung meiner Arbeit. Desweiteren danke ich Prof. Dr. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit, am Institut für experimentelle Neurologie einen grossen Teil der Experimente duchführen zu können sowie Frau Dr. Dorette Freyer und Frau Renate Gusinda für die Unterstützung während der praktischen experimentellen Arbeit.

Meine liebste Mutter hat mir mit ihrer unermüdlichen Geduld und Zuversicht zwei Hochschulstudien und diese Doktorarbeit möglich gemacht.

Berlin, den 4. September 2005

Eidestattliche Erklärung

Ich, Ulrike Susanne Harms geb. Herwig erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle der Quinonoxidoreduktase bei der Progression des neuronalen Zelltodes und Charakterisierung endogener neuroprotektiver Systeme“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 4. September 2005